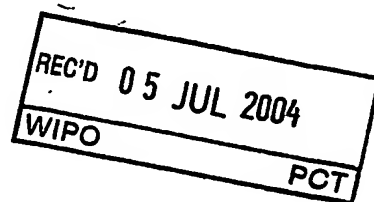


# BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

**PRIORITY  
DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



## Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

BEST AVAILABLE COPY

**Aktenzeichen:**

10 2004 010 720.3

**Anmeldetag:**

04. März 2004

**Anmelder/Inhaber:**

novosom AG, 06120 Halle/DE

**Bezeichnung:**

Liposomale Depotsysteme zum Delivery von Oligonukleotiden

**IPC:**

A 61 K 31/713

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 15. Juni 2004  
Deutsches Patent- und Markenamt  
Der Präsident  
Im Auftrag

Dzierzon



~~Belegexemplar~~

5

**Liposomale Depotsysteme zum Delivery von Oligonukleotiden**

10

20

25

30

**35 Zusammenfassung**

Die Erfindung betrifft liposomale Formulierungen zur Herstellung eines liposomalen Depots von Oligonukleotiden zur langanhaltenden Freisetzung und Wirkung in einem Säugerkörper.

## Belegexemplar

## Stand der Technik

Oligonukleotide werden im Körper durch Enzyme sehr schnell abgebaut. Die Wirkstoffe werden normalerweise in hohen Dosen durch intravenöse Injektionen verabreicht, die jedoch häufig wiederholt werden müssen. Um die „patient compliance“ zu erhöhen und die Dosis verringern zu können wird daher ein geeignetes Deliverysystem benötigt, das den Wirkstoff im Körper vor Abbau schützt und ihn nur langsam und verzögert freisetzt.

Meist werden heute Delivery-Systeme verwendet, welche nach Verabreichung das intrazelluläre Delivery der Wirkstoffe unterstützen. Dazu zählen liposomale Systeme, polymerbasierte Systeme (z.B. PEI) und virale Carrier. Diese intrazellulären Delivery-Strategien können zu einer Dosisverringerung der Wirkstoffe führen. Eine Reduktion der Injektionen kann allerdings nicht erreicht werden.

Eine weitere Möglichkeit Oligonukleotide zu verabreichen stellen Depotsysteme dar, die lokal appliziert werden und die Wirkstoffe gleichmäßig über einen bestimmten Zeitraum freisetzen. Diese Delivery-Strategien unterstützen das intrazelluläre Delivery der Wirkstoffe nicht zwingend, vielmehr führen sie zu einem steady-state Spiegel des Wirkstoffes über die Zeit im Blut oder Gewebe. Dadurch kann die Injektionshäufigkeit verringert werden und darüber hinaus ist durch das Aufrechterhalten der Wirkstoffkonzentration eine Dosisreduktion möglich.

Mikro- oder Nanopartikel aus biokompatiblen Polymeren stellen eine mögliche Form eines solchen Depotsystems dar. In US 6,555,525 wird die verzögerte Freisetzung von Antisense-Oligonukleotiden aus PLGA-Mikrokapseln nach subkutaner Injektion in einem Maus-Leukämie-Modell beschrieben. Die verzögerte Freisetzung von Oligonukleotiden aus PLGA-basierten Mikro-bzw. Nanokapseln wird in zahlreichen anderen Publikationen ebenfalls beschrieben (z.B. J. Drug Target. 5(4), 291-302, (1998); Gene Ther. 9 (23), 1607-16, (2002); Antisense Nucleic Acid Drug Dev. 9(5), 451-8, (1999), J. Control. Release 37, 173-183, (1995)).

## Belegexemplar

In weiteren Patenten und Publikationen werden andere Polymerbasierte Systeme zum Delivery von Nukleinsäuren beschrieben. In Methods: A companion to Methods in Enzymology, 18, 286-295, (1999) weisen die Autoren z.B. auf die mögliche Anwendung der beschriebenen Polyhexylcyanoacrylate-Nanopartikel als Depotsystem für Oligonukleotide hin.

Nachteilig der Mikro- oder Nanopartikel aus Polymeren ist deren Herstellungsprozess. Hier müssen in den meisten Fällen Emulsionsprozesse zur Anwendung kommen, unter Verwendung organischer, nicht mit Wasser mischbarer Lösungsmittel. Diese Lösungsmittel müssen nach Prozessende wieder vollständig entfernt werden. Dadurch stellen sie ein nicht zu unterschätzendes regulatorisches Problem dar. Darüber hinaus entstehen bei der Hydrolyse der PLGA-Kapseln sehr niedrige pH-Werte im Innern der Kapseln, wodurch die Integrität der eingeschlossenen Wirkstoffe Schaden nehmen kann. So ist es bekannt, dass Purinbasen bei niedrigen pH-Werten bevorzugt abhydrolysieren.

Liposomen sind ebenfalls eine mögliche Form eines Trägersystems. Sie sind aufgebaut aus einer oder mehreren Lipid-Doppelschichten und umschließen in ihrem Innern ein wässriges Kompartiment, in welches wasserlösliche Substanzen eingeschlossen werden können. In die Lipid-Doppelschicht können lipophile Substanzen eingebaut werden.

Zahlreiche Publikationen beschäftigen sich mit der Anwendung von meist kationischen liposomalen Systemen zum Delivery von Oligonukleotiden in vivo (z.B. Molecular Membrane Biology, 16, 129-140, (1999); BBA 1464, 251-261, (2000); Reviews in Biology and Biotechnology, 1(2), 27-33, (2001). All diesen Systemen gemein ist jedoch die Tatsache, dass die verwendeten Lipid-Mischungen aus ungesättigten Lipiden wie z.B. DOTAP oder DOPE aufgebaut sind und aus diesem Grund nicht serumstabil sind. Dadurch bedingt setzen diese Liposomen eingeschlossenen Wirkstoff sehr schnell nach der Injektion frei. Häufig werden für die oben genannten Anwendungen auch Komplexe aus vorgeformten Liposomen und Nukleinsäuren hergestellt (z.B. Lipoplexe). Die Komplexbildung bzw. die meist nicht im Serum stabilen liposomalen Formulierungen führen dazu, dass

**Belegexemplar**

die Stabilität der Oligonukleotide über einen längeren Zeitraum, wie für ein Depot erforderlich, nicht gewährleistet ist.

Aufgabe der Erfindung war es nun, neue, stabile Liposomen als Depotformulierungen für Oligonukleotide bereitzustellen, die eine langfristige Freisetzung des Wirkstoffes über mindestens eine Woche erreichen und eine gute Verträglichkeit im Organismus aufweisen. Eine weitere Aufgabe war es, Depotsysteme bereitzustellen, die keinen burst release des Wirkstoffes aufweisen.

#### Zusammenfassung der Erfindung

Die Aufgabe wird gelöst durch die Formulierung der Wirkstoffe in Liposomen, die insbesondere bei der Anwendung als Depot in Form von Aggregaten vorliegen. Solche Liposomen umfassen in einer Ausführung der Erfindung neben neutralen Lipiden auch kationische Lipide.

Die Erfindung basiert auf der Beobachtung, dass positiv geladene Liposomen gut mit Komponenten des Serums oder der Interstitialflüssigkeit aggregieren und in diesem Zustand an der Einstichstelle verbleiben müssen. Ein Wegdiffundieren des Depots von der Einstichstelle wird damit vermieden.

Depots ohne burst release werden dadurch bereitgestellt, dass in diesem Fall aussen an den Liposomen anhaftender Wirkstoff abgetrennt wird.

#### Ausführliche Beschreibung der Erfindung

In einer bevorzugten Ausführung der vorliegenden Erfindung werden Liposomen, die aus neutralen und kationischen Lipiden aufgebaut sind, als liposomales Depotsystem für die verzögerte Freisetzung von Oligonukleotiden eingesetzt.

Oligonukleotide werden im Körper sehr schnell abgebaut und müssen daher durch wiederholte Injektionen verabreicht werden. Die für diese Ausführung der Erfindung relevanten Oligonukleotide sind aus 5-100, bevorzugt aus 5-40 und besonders bevorzugt aus 10-25

## Belegexemplar

Nukleotiden oder Basenpaaren aufgebaut. Darüberhinaus können die Oligonukleotide als Einzelstrang (z.B. Antisense-Oligonukleotide), als Doppelstrang (z.B. small-interfering RNA, Decoy-Oligonukleotide) oder in komplexer Faltung (z.B. Aptamere, Spiegelmere, Ribozyme) vorliegen. Alle für diese Erfindung relevanten Oligonukleotide sind aus Desoxyribonukleotiden oder aus Ribonukleotiden sowie aus deren chemisch-modifizierten Derivaten aufgebaut (z.B. Phosphorothioate DNA (PS), 2'-O-methyl RNA (OMe), 2'-O-methoxy-ethyl RNA (MOE), Peptide nucleic acid (PNA), N3'-P5' Phosphoroamidate (NP), 2'-fluoro-arabino nucleic acid (FANA), Locked nucleic acid (LNA), Morpholino phosphoroamidate (MP), Cyclohexene nucleic acid (CeNA), Tricyclo-DNA (tcDNA)). Darüber können Copolymere und Block-Copolymere verschiedener Nukleotide und sogenannte Gapmere in die Liposomen eingeschlossen werden.

In einer vorteilhaften Ausgestaltung der Erfindung werden Aptamere oder Spiegelmere in das liposomale Depot eingeschlossen.

Aptamere sind DNA- oder RNA-basierte Oligonukleotide mit komplexer dreidimensionaler Struktur. Aufgrund dieser Struktur können Aptamere sehr spezifisch und hochaffin an Proteintargets binden und wirken somit therapeutisch, meist extrazellulär. Ihre Funktionalität ist nahezu identisch zu monoklonalen Antikörpern.

Spiegelmere sind im Gegensatz zu D-Oligonukleotiden aus L-Ribose- und L-2'-Desoxyribose-Einheiten aufgebaut. Genau wie Aptamere binden diese spiegelbildlichen Nukleinsäuren spezifisch an Proteintargets. Aufgrund der chiralen Inversion besitzen Spiegelmere im Gegensatz zu herkömmlichen D-Oligonukleotiden eine erhöhte Stabilität gegenüber einem enzymatischen Abbau.

Als Liposomenbildner kommen membranbildende und membranständige Lipide in Frage, wobei diese natürlichen oder synthetischen Ursprungs sein können. Hierzu zählen insbesondere Cholesterol und Derivate, Phosphatidylcholine, Phosphatidylethanolamine als neutrale Lipide. Besonders bevorzugt werden die vollständig gesättigten Verbindungen dieser Klasse verwendet, wie beispielsweise die Dimyristoyl-, Dipalmitoyl- oder Distearoyl-derivate der Phosphatidylcholine und Phosphatidylethanolamine.

Kationische Lipide zur Ausführung der Erfindung umfassen beispielsweise:

- DAC-Chol 3- $\beta$ -[N-(N,N'-dimethylaminoethane) carbamoyl]cholesterol
5. DC-Chol 3- $\beta$ -[N-(N',N'-dimethylaminoethane) carbamoyl]cholesterol
- TC-Chol 3- $\beta$ -[N-(N',N', N'-trimethylaminoethane) carbamoyl]cholesterol
- BGSC Bis-guanidinium-spermidine-cholesterol
- BGTC Bis-guanidinium-tren-cholesterol,
- 10 DOTAP (1,2-dioleoyloxypropyl)-N,N,N-trimethylammonium chlorid
- DOSPER (1,3-dioleoyloxy-2-(6-Carboxy-spermyl)-propylamid)
- DOTMA (1,2-dioleoyloxypropyl)-N,N,N-trimethylammonium chlorid)
- (Lipofectin®)
- 15 DORIE (1,2-dioleoyloxypropyl)-3 dimethylhydroxyethyl ammoniumbromid)
- DOSC (1,2-dioleoyl-3-succinyl-sn-glycerol cholinester)
- DOGSOSO (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-succinyl-2hydroxyethyl disulfide ornithin),
- 20 DDAB Dimethyldioctadecylammonium bromid
- DOGS ((C18)<sub>2</sub>GlySper3<sup>+</sup>) N,N-dioctadecylamido-glycyl-spermin
- (Transfectam®)
- (C18)<sub>2</sub>Gly<sup>+</sup> N,N-dioctadecylamido-glycin
- DOEPC 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-ethylphosphocholin oder andere O-Alkyl-Phosphatidylcholin oder-ethanolamine,
- 1,3-bis-(1,2-bis tetradecyloxy-propyl-3 dimethylethoxy ammonium-bromid) propan- 2-ol (Neophectin®),
- sowie von allen genannten Lipiden mit ungesättigten Fettsäure- und/oder Fettalkoholketten deren gesättigte Derivate mit
- 30 Dimyristoyl-, Dipalmitoyl-, oder Distearoylketten.

Bevorzugte kationische Lipide zur Ausführung der Erfindung umfassen

Cholesteryl 3 $\beta$ -N-(Dimethyl-aminoethyl)carbamate (DC-Chol), 3- $\beta$ -[N-(N,N'-dimethylaminoethane) carbamoyl]cholesterol (DAC-Chol); (N-[1-

35 (2,3-Dimyristoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium Salz (DMTAP),

(N-[1-(2,3-Dipalmitoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium Salz

## Belegexemplar

(DPTAP), (N-[1-(2,3-Dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium Salz (DOTAP):

In einer bevorzugten Zusammensetzung werden gesättigte synthetische Phosphatidylcholine, wie DMPC, DPPC oder DSPC, Cholesterin, die kationischen Lipide DC-Chol, DAC-Chol, DMTAP, DPTAP oder DOTAP verwendet, wobei ganz besonders bevorzugt der Anteil der kationischen Lipide zwischen 5 und 20mol% beträgt und der Anteil aller sterolbasierten Lipide zwischen 35 und 60% beträgt.

In einer vorteilhaften Ausgestaltung der Erfindung werden pH-sensitiv kationische Lipide eingesetzt, wie sie in WO 02 066490 und US 5965434 beispielhaft offenbart sind. Solche Liposomen können durch pH-Wechsel in einen neutralen Ladungszustand gebracht werden und ermöglichen so die einfache Abtrennung von aussen anhaftendem Wirkstoff. Beispiele für pH-sensitiv kationische Verbindungen sind:

Histaminyl-Cholesterolhemisuccinat (His-Chol),  
Morpholin-N-ethylamino-cholesterolhemisuccinat (Mo-Chol),  
4-(2,3-bis-palmitoyloxy-propyl)-1-methyl-1H-imidazol (DPIM),  
Cholesterol-(3-imidazol-1-yl propyl) carbat (CHIM).

Die Größe der Liposomen variiert von 20-1000 nm, bevorzugt von 50-800 nm und ganz besonders bevorzugt von 50-300 nm.

Für den Einschluss des gewünschten Wirkstoffes in die Liposomen wird dieser in einer Pufferlösung gelöst, mit welcher dann die Liposomen hergestellt werden. Wird bei geringen Ionenstärken gearbeitet, bindet der Oligonukleotid-Wirkstoff aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen während der Herstellung der Liposomen an die kationische liposomale Membran. Je nach den Ladungsverhältnissen (liposomale Membran zu Oligonukleotid) bindet der Wirkstoff vollständig oder nur zu einem Teil an die Membran. Sollte überschüssiges Oligonukleotid nicht binden, wird dieses mittels des passiven Einschlussverfahrens, welches dem Fachmann bekannt ist, eingeschlossen. Durch das Ausnutzen der elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen Liposom und Wirkstoff können hohe Einschlusseffizienzen erreicht werden.

Wird der Oligonukleotid-Wirkstoff in die Liposomen eingeschlossen, können sich Aggregate bilden, da ein anionisch geladener Wirkstoff



## Belegexemplar

mit den kationischen geladenen Liposomen wechselwirkt. In einer Ausführungsform der Erfindung wird der aussen an der liposomalen Membran anhaftende Wirkstoff durch eine Erhöhung der Ionenstärke von der Lipidmembran abgelöst, wodurch sich eine stabile Suspension bildet, welche steril filtriert werden kann.

In einer ersten Ausführung der erfinderischen Lehre verbleibt der freie Wirkstoff ganz oder teilweise, aber zu mehr 5% in der Liposomensuspension und sorgt für das schnelle initiale Anfluten des Wirkstoffes im Blut oder im Gewebe.

In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung wird der an der liposomalen Membran anhaftende Wirkstoff nicht von der Membran abgelöst, d.h. die Ionenstärke wird nicht verändert. Der Vorteil dieser Ausführung liegt in der Lyophilisierbarkeit der Suspension, da eine Freisetzung des innen eingeschlossenen Wirkstoffes während des Lyophilisationsvorganges minimiert wird, da sowohl auf der Innen- wie auf der Außenseite der Membran die gleich Wirkstoffkonzentration vorliegt.

In einer dritten bevorzugten Ausführungsform der erfinderischen Lehre wird der aussen an den Liposomen anhaftende Wirkstoff abgetrennt. Das kann durch beispielsweise durch eine Ultrafiltration erreicht werden. Aus solchen Liposomen wird der eingeschlossene Wirkstoff ohne initialen burst release freigesetzt. Dadurch können toxische Nebenreaktionen bei einer initialen Überdosierung vermieden werden.

Für die Herstellung der Liposomen werden nach dem Stand der Technik etablierte Verfahren, wie Extrusion durch Polycarbonat-Membranen, Ethanolinjektion oder Hochdruckhomogenisation verwendet.

Die Erfindung wird durch das folgende Beispiel weiter erläutert, ohne auf diese Ausführungen begrenzt zu sein.

**Belegexemplar**

Beispiel:

**Einschluss von Cy5.5 anti CD40 ODN (Antisense-Oligonukleotid) in Liposomen**

5

Ein Lipidmischung folgender Zusammensetzung:

Formulierung	Zusammensetzung
L1	DPPC/DC-Chol/Chol 60:10:30 (mol%)

10

15

wird bei 50°C in Chloroform gelöst und anschließend im Rotationsverdampfer im Vakuum vollständig getrocknet. Der Lipidfilm wird mit soviel Cy5.5 anti CD40 ODN (Antisense-Oligonukleotid) (150 µg/ml in 10 mM HEPES, 300 mM Sucrose, pH 7,5) versetzt, dass eine 15 mM Suspension entsteht. Anschließend wird diese Suspension für 45 Minuten im Wasserbad bei 50°C unter Schwenken hydratisiert und für weitere 5 Minuten im Ultraschallbad behandelt. Danach wird die Suspension eingefroren. Es folgen 3 Einfrier- und Auftauprozesse, wobei nach dem Auftauen jeweils eine 5-minütige Behandlung im Ultraschallbad erfolgt.

20

Nach dem letzten Auftauen werden die Liposomen mehrfach durch eine Membran mit einer Porenweite von 200nm oder 400nm extrudiert (Avestin LiposoFast, Polycarbonat-Membran mit einer Porenweite von 200 oder 400nm). Nach der Extrusion wird die Ionenstärke der erhaltenen Suspension durch Zugabe einer NaCl-Stammlösung erhöht.

25

Der Anteil des eingeschlossenen Cy5.5 anti CD40 ODN (Antisense-Oligonukleotid) wird nach Abtrennung des frei vorliegenden Wirkstoffes durch dreimalige Sedimentation in der Ultrazentrifuge bei 60000 x g über 45 min fluoreszenzspektroskopisch ermittelt. Die Einschlusseffizienz des Oligonukleotids liegt bei 47%.

30

## Ansprüche

## Belegexemplar

1. Verwendung von liposomalen Formulierungen zur verzögerten Wirkstofffreisetzung über mindestens eine Woche, dadurch

5 gekennzeichnet, dass

- die Liposomen kationische und gesättigte neutrale Lipide umfassen,
- der Wirkstoff Oligonukleotide umfasst.

10

2. Verwendung einer liposomalen Formulierung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass

- die neutralen Lipide ausgewählt werden aus gesättigten synthetischen Phosphatidylcholinen, wie DMPC, DPPC, DSPC und/oder Cholesterin,
- die kationischen Lipide ausgewählt werden aus DC-Chol, DAC-Chol, DMTAP, DPTAP oder DOTAP, wobei der Anteil der kationischen Lipide zwischen 5 und 20mol% und der Anteil aller sterolbasierten Lipide zwischen 35 und 60% beträgt.

20

3. Verwendung einer liposomalen Formulierung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass

- die liposomale Formulierung pH-sensitiv kationische Lipide umfasst, die insbesondere ausgewählt sind aus der Gruppe: His-Chol, Mo-Chol, CHIM, DPIM.

25

4. Verwendung einer liposomalen Formulierung nach einem der Ansprüche 2 oder 3 dadurch gekennzeichnet, dass

- die Oligonukleotide aus 5-100, bevorzugt aus 5-40 und besonders bevorzugt aus 10-25 Desoxyribonukleotiden, Ribonukleotiden oder deren chemisch-modifizierten Derivaten aufgebaut sind.

35

5. Verwendung einer liposomalen Formulierung nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass

die Oligonukleotide als Einzelstrang (z.B. Antisense-Oligonukleotide); als Doppelstrang (z.B. small-interfering RNA, Decoy-Oligonukleotiden) oder in komplexer Faltung (z.B. Aptamere, Spiegelmere) vorliegen.

6. Liposomale Formulierung nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass

das Oligonukleotid ein Aptameres ist.

7. Liposomale Formulierung nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass

das Oligonukleotid ein Spiegelmeres ist.

8. Verfahren zur Herstellung einer liposomalen Formulierung nach einem oder mehrerer der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass

- der Wirkstoff in einer wässrigen Pufferlösung geringer Ionenstärke gelöst wird, mit welcher dann die Liposomen hergestellt werden.
- der aussen an der liposomalen Membran anhaftende Wirkstoff durch eine Erhöhung der Ionenstärke von der Lipidmembran abgelöst wird und
- zu mehr als 5% in der Liposomensuspension verbleibt.

9. Verfahren zur Herstellung einer liposomalen Formulierung nach einem oder mehrerer der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass

- der Wirkstoff in einer wässrigen Pufferlösung geringer Ionenstärke gelöst wird, mit welcher dann die Liposomen hergestellt werden.
- der aussen an der liposomalen Membran anhaftende Wirkstoff nicht abgelöst wird.

10. Verfahren zur Herstellung einer liposomalen Formulierung nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass

- der Wirkstoff in einer wässrigen Pufferlösung geringer Ionenstärke gelöst wird, mit welcher dann die Liposomen hergestellt werden.
- der aussen an der liposomalen Membran anhaftende Wirkstoff nicht abgelöst wird und
- der abgelöste Wirkstoff von den Liposomen abgetrennt wird.

10

This Page is inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record

## BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☒ BLACK BORDERS

☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

☒ FADED TEXT OR DRAWING

☒ BLURED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

☒ SKEWED/SLANTED IMAGES

☐ COLORED OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

☐ GRAY SCALE DOCUMENTS

☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

☐ REPERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images  
problems checked, please do not report the  
problems to the IFW Image Problem Mailbox**